WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, C12P 21/08

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/08576

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

30. Maz 1995 (30.03.95)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP94/03175

(22) Internationales Anmeldedatum:

22. September 1994 (22.09.94)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäischet Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

(30) Prioritätsdaten:

P 43 32 256.5

22. September 1993 (22.09.93) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: LIPP, Martin [DE/DE]; Trappentreustrasse 23, D-80339 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FÖRSTER, Reinhold [DE/DE]; Stiftbogen 57, D-81357 München (DB). EM-RICH, Thomas [DE/DE]; Blombergerrasse 9, D-82393 Iffeldorf (DE). WOLF, Ingrid [DE/DE]; Thalkirchoerstrasse 143, D-81371 München (DE). KREMMER, Elisabeth [DE/DE]; Untere Hauptstrasse 28, D-85354 Freising (DE).
- (74) Anwalt: MÜLLER-BORÉ & PARTNER: Isartorplatz 6, D-80331 München (DE).

Veröffentlicht

Mit insernationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen einsreffen.

- (54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST LEUKOCYTE-SPECIFIC G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS
- (54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKORPER GEGEN LEUKOZYTEN-SPEZIFISCHE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEP-TOREN

(57) Abstract

Monoclonal antibodies against leukocyte-specific G-protein-coupled receptors (L-GCR) are disclosed. These antibodies may be produced by the following steps: (a) introduction of a L-GCR coding nucleic acid into cells and expression of L-GCR; (b) immunisation of animals with L-GCR-expressing cells (a); and (c) fusion of spleen cells from the immunised animals (b) with myeloma cells and production of monocional L-GCR antibody-producing hybridoma cells. Also disclosed is a process for producing such antibodies, their use and kits containing the same, as well as a process for producing monoclonal GCR antibodies.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung berifft monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (L-GCR). Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrensschnitte erhältlicht (a) Einführung einer L-GCR-cotierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von L-GCR, (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikösper-produzierenden Hybridomzellen. Ferner betrifft die Ersindung Verfahren zur Herstellung solcher Antikurper, ihre Verwendung und sie embaltende Kits. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung monoklonaler GCR-Antikörper.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT .	Överzeich	GA	Gebos	MR	Matretanien
ΑŪ	Australies	G3	Vereinigtes Königreich	MW	Malewi
BB	Berbedos	GE	Georgica	NB	Niger
BE	Belgies	GN	Guinea	NL .	Niederlande
BF	Buricina Faso	GR	Griechesiand	NO	Norwegez
BG	Bulgarien	HU	Uzgam	NZ	Neusecland
rj	Beain	IE	Mand	FL	Polen
BR	Bracilies	T	Italics	. PI	Portugal
BY	Beinrus	JР	Japan	RO	Remission
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Restucte Fideration
Œ	Zestrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisista	820	Sactor
CG	Koogo	KP	Depokratische Volkarepublik Kores	æ	Schwedes
Œ	Schweiz	K)R	Republik Korca	81	Slowenien
a	Côte d'Ivoire	KZ	Karachstan	SX	Slovakei
CM	Kamerus	Ц	Liccinentin	8N	Strangel
CN	China	LK	Sri Lanka	ID	Technol
CS	Techochoslowalze	LU	Lucronistry	TG	Togo
ĊZ.	Tachechische Republik	LV	Lettland	I	Tadachildatan
DE	Despobland	MC	Mossoo	77	Trinidad und Tobago
DK	Diamerk	M D	Republik Moldan	ŪΑ	Ukraine
E8	Spatries	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
Ħ	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Praniceich	MN	Mongolei	YN	Victor

WO 95/03576 - PCT/EP94/03175

Monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sowie sie enthaltende Kits. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

Es ist bekannt, daß bei der Transduktion von Signalen in einem Organismus Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Nach Bindung der Liganden an Zellmembran-integrierte Rezeptoren wird das Signal über verschiedene Mechanismen intrazellulär weitergeleitet und verarbeitet. Es gibt verschiedene Familien dieser Rezeptoren, die sich durch bestimmte Strukturmerkmale unterscheiden. Die sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, international abgekürzt als GCR (G protein-coupled receptors), werden in eine Familie zusammengefaßt. Das G-Protein ist ein heterotrimärer GTP-bindender Proteinkomplex, der aus den drei Untereinheiten G-alpha, G-beta und G-gamma aufgebaut ist. Es reguliert zelluläre Aktivitäten durch Austausch von GDP gegen GTP an seiner alpha-Untereinheit und aktiviert bzw. inaktiviert somit eine Reihe von Effektoren, wie Adenylylcyclasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen und Ionenkanäle. Als Vertreter von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden Rezeptoren für Hormone und Neurotransmitter angesehen. Zu ihnen gehören adrenerge und muscarinerge Rezeptoren wie auch Rezeptoren für Dopamin, der Substanz P, Thyreotropin, Morphin u. a..

Desweiteren ergeben sich zunehmend Hinweise, daß G-Proteingekoppelte Rezeptoren auch an der Regulation der Aktivierung,
Hemmung, Migration und Zell-Zell-Interaktion immunkompetenter
Zellen beteiligt sind. Es ist bekannt, daß die Aktivierung von
Leukozyten durch Entzündungsmediatoren, wie formyl-MLP, Anaphylatoxin C5a, Prostaglandine, Interleukin-8, MIP-1a und MIP1ß sowie RANTES, ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt. Eine Blockierung dieser Rezeptoren würde eine
Entzündungshemmung bewirken. Mittel hierfür wurden jedoch

bisher noch nicht gefunden.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit denen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren blockiert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch Bereitstellung monoklonaler Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (L-GCR) erreicht. Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrensschritte erhältlich:

- (a) Einführung einer L-GCR-codierenden DNA in Zellen und Expression von L-GCR,
- (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und
- (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Anti-körper-produzierenden Hybridomzellen.

Die L-GCR-codierende Nukleinsäure kann eine DNA, insbesondere eine genomische oder eine cDNA sein. Ferner kann sie eine RNA sein. Die Nukleinsäuren können durch übliche aus der Literatur bekannte Verfahren bereitgestellt werden (vgl. z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982); Lipp et al., Eur. J. Immunol. 22 (1992), 2795-2799).

Erfindungsgemäß können in die L-GCR-codierende Nukleinsäure Modifikationen, wie Additionen, Deletion und/oder Substitution von ein oder mehr Basen eingeführt werden. Additionen umfassen Markersequenzen, die z.B. an das 5'-Ende oder 3'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert werden. Solche Markersequenzen sind z.B. Codons, die für ein Protein bzw. Proteinfragment codieren, gegen das ein monoklonaler Antikörper existiert. Mit letzerem kann die Expression des Proteins bzw.

3

Proteinfragments und damit auch die von L-GCR nachgewiesen werden (vgl. von Zastrow und Kobilka, J. Biol. Chem. 267 (1992), 3530-3538; von Zastrow et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 763-766; T. Emrich, M. Lipp, unveröffentlicht). Markersequenzen können auch in die für L-GCR codierende Nukleinsäure, z.B. in die für die extra-zellulären oder intra-zellulären Domänen codierenden Sequenzen, eingefügt werden. Weitere Additionen sind Sequenzen, die eine Lokalisierung von L-GCR in der Zellmembran von L-GCR-exprimierenden Zellen gewährleisten. Solche Sequenzen können für Signalpeptide, Membranproteine oder Pragmente davon codieren. Üblicherweise werden sie an das 5'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert.

Erfindungsgemäß kann die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegen. Diese umfaßt die für die Transkription und Translation der L-GCR-codierenden Nukleinsäure notwendigen Sequenzen, wie Promotor-, Enhancer-, Ribosomenbindungs-, Transkriptionsonsstart- und stop- sowie Translationsstart- und stop-Sequenzen. Die Expressionseinheit kann ferner in einem Vektor vorliegen. Dies kann auch ein Virus sein. Dem Fachmann ist bekannt, welche der Sequenzen der Expressionseinheit in welcher Anordnung notwendig sind, um L-GCR in bestimmten Zellen exprimieren zu können. Desweiteren weiß der Fachmann, welche Vektoren für welche Zellen geeignet sind.

Erfindungsgemäß wird die L-GCR-codierende Nukleinsäure in Zellen eingeführt, um L-GCR zu exprimieren. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren und Bedingungen zur Transfektion von Zellen mit Nukleinsäure angewandt werden. Beispiele sind das Calciumphosphat-Prāzipitations-, das DEAE-Dextran-, das Elektroporations- und das Lipidvesikel-Verfahren. Günstigerweise wird das Calciumphosphat-Präzipitations- verfahren angewandt, wobei etwa 1-2x10 $^{\circ}$ Zellen mit etwa 15 μ g L-GCR-codierender Nukleinsäure transfiziert werden. Als Zellen können eukaryotische und prokaryotische Zellen verwendet werden. Bevorzugt sind eukaryotische Zellen, insbesondere Säuge-

4

tier-, z.B. CHO-, COS- und 293-Zellen, Hefe- und Insektenzellen. Die Zellen sind dem Fachmann bekannt und allgemein erhältlich. Die Expression von L-GCR kann indirekt nachgewiesen
werden, z.B. durch Nachweis der Expression von Markersequenzen, die von der L-GCR-codierenden Nukleinsäure umfaßt werden,
oder durch Ligandenbindung. Der Nachweis kann mittels üblicher, aus der Literatur bekannter Verfahren, z.B. der Immunfluoreszenz, der Immunenzymologie, der ELISA-Technik, der
Durchflußcytometrie und den Ligandenbindungstests erfolgen.

Erfindungsgemäß wird ein Tier mit L-GCR-exprimierenden Zellen immunisiert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen gewählt werden. Günstigerweise werden ca. 3x10⁷-Zellen einem Tier zweimal verabreicht, wobei etwa 28 Tage zwischen den Verabreichungen liegen. Als Tiere können übliche Versuchstiere, insbesondere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse, verwendet werden. Als besonders günstig sind Ratten zu erwähnen.

Erfindungsgemäß werden dem immunisierten Tier Milzzellen entnommen. Dies kann in üblicher und bekannter Weise erfolgen. Günstigerweise werden Milzzellen ca. 60 Stunden nach der zweiten Verabreichung des Antigens dem Tier entnommen. Sie werden dann mit Myelomzellen mittels PEG fusioniert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen verwendet werden. Günstigerweise werden als Myelomzellen solche der Mäuse-Myelomzellinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979), 1548-50) verwendet und das Verhältnis der Milzzellen zu den Myelomzellen beträgt etwa 1 : 3. Etwa 1 Woche nach Fusion werden die Überstände der fusionierten Zellen auf Antikörperproduktion getestet. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren durchgeführt werden. Günstigerweise wird eine Durchflußcytometrie durchgeführt. In ihr werden Vergleichsmessungen der Hybridomzell-Überstände auf Zellen durchgeführt, die mit L-GCR-codierender Nukleinsäure transfiziert worden bzw. unverändert (nicht transfiziert) sind. Antikörper-produzierende Hybridomzellen werden dann durch übliche

aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren, z.B. der Limiting Dilution-Technik, kloniert.

Eine solche den Antikörper RF8B2 produzierende Hybridomzelle wurde am 8. Sept. 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascherodeweg 1b, 38124 Braunschweig (DSM) unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2153 hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper eignen sich für diagnostische Maßnahmen, insbesondere für die Bestimmung des Immunstatus eines Patienten. Hierfür werden sie z.B. mit Fluorochromen oder Biotin markiert und zusammen mit anderen markierten, allgemein erhältlichen T-Zell- bzw. B-Zell-spezifischen Antikörpern und Körperflüssigkeiten des Patienten inkubiert. Es wird der Anteil an T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, T-Helfer, und T-Helfer, Zellen bzw. rezirkulierenden, nicht aktivierten B-Zellen bestimmt. Dies ermöglicht eine Aussage über den Immunstatus des Patienten. Ferner können die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper zum Nachweis von Erkrankungen, insbesondere von Tumoren, Leukämien, Lymphomen, Immunschwächen und Autoimmunerkrankungen verwendet werden.

Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper für therapeutische Maßnahmen. Durch Bindung an den Rezeptor beeinflussen sie die Bindung des physiologischen Liganden oder führen durch ihre Bindung selbst zu einer Aktivierung oder Hemmung des Rezeptors. Die erfindungsgemäßen Antikörper eignen sich zur Hemmung von Entzündungen und zur Reduzierung der B-und T-Zellaktivierung. Sie können ferner die Migration und Interaktion von Zellen beeinflussen. Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen Antikörper, allein oder in Kombination mit anderen Antikörpern (z.B. gegen Adhäsionsmoleküle) oder Therapeutika, eine Tumormetastasierung zu unterdrücken. Durch Hemmung der Ligandenbindung an L-GCR wird eine Reduzierung der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen bewirkt, was entscheidend die Tumormetastasierung hemmt.

Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Antikörper mit bekannten Zelltoxinen, z.B. Ricin, oder Therapeutika gekoppelt werden, wodurch entartete Zellen selektiv behandelt werden können. Nach Bindung der Antikörper kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Komplexes und mithin zur effektiven Aufnahme des gekoppelten Toxins oder der Therapeutika. Der vorstehend genannte Antikörper RF8B2 ist hierfür besonders geeignet, da er der Subklasse IgG₂₀ angehört, die bekannterweise äußerst gering immunogen ist.

Die erfindungsgemäßen Antikörper werden für die Verabreichung in therapeutischen Maßnahmen, z.B. als Medikament, in üblicher Weise konfektioniert.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der sich zur Durchführung vorstehend angesprochener diagnostischer Maßnahmen eignet. Ein solcher Kit enthält

- markierten L-GCR-Antikörper, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper. oder
- markierten L-GCR-Antikörper und markierten T-Zell-spezifischen Antikörper und/oder B-Zell-spezifischen Antikörper sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.

Ergänzend wird ausgeführt, daß in Schritt (a) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR-Antikörpern die L-GCR-codierende Nukleinsäure durch eine Nukleinsäure ersetzt werden kann, die für einen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR), z.B. einen Hormon- oder Neurotransmitter-Rezeptor codiert. Dies führt dann zur Expression von GCR in Zellen und weiter nach Immunisierung eines Tieres mit solchen Zellen und Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres mit Myelomzellen zu Hybridomzellen, die monoklonale GCR-Antikörper produzieren. Erfindungsgemäß wird also auch ein Verfahren bereit-

gestellt, das sich zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eignet.

Schließlich wird darauf hingewiesen, daß anstelle der Schritte (a) und (b) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR- bzw. GCR-Antikörpern die Nukleinsäure direkt in ein Tier zur Expression von L-GCR bzw. GCR eingeführt werden kann, wodurch das Tier immunisiert wird. Ferner kann anstelle der Fusion von Schritt (c) ein anderes aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren zur Immortalisierung von Milzzellen verwendet werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion eines Plasmids zur Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen.

Eine für L-GCR-codierende cDNA (vgl. Lipp et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22, 2795-2799) wurde in die Restriktionsschnittstellen EcoRI und Xbal des bekannten und allgemein erhältlichen prokaryotischen Klonierungsvektors pBluescript II KS+ eingefügt, wobei zuvor folgende Modifizierungen vorgenommen wurden. Im 5'-untranslatierten Bereich wurde mittels eines synthetischen Oligonukleotids 10 Basenpaare vor dem Translationsstartcodon eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI eingefügt und der Bereich vor dem Translationsstartcodon derart verändert, daß eine effiziente Initiation der Translation erfolgt (vgl. Kozak M., Cell (1986) 44, 283-292). Das Tranlationsstopcodon wurde mittels Polymerasekettenreaktion entfernt und die L-GCR-codierende DNA mit einem synthetischen Oligonukleotid derart rekombiniert, daß auf Proteinebene an den Carboxy-Terminus des L-GCR-Proteins die Aminosäuresequenz PGGSGPEQKLISEEDLL fusioniert wurde. Die Sequenz der letzten 11 Aminosäuren stammt aus dem MYC-Protein und wird vom monoklonalen Antikörper 9E10 erkannt (vgl. Bishop, J.M. et al., Mol.Cell.Biol.5 1985),3610-3616; Munro S., Cell 46 (1986), 291-300), während die ersten sechs Aminosäuren als Abstandshalter dienen, um eine ungestörte Faltung des MYC-Epitops zu ermöglichen. Die erhaltene rekombinante DNA wurde in die Restriktionsschnittstellen HindIII und Xbal des bekannten und allgemein erhältlichen eukaryotischen Expressionsvektors RC/CMV, der die Expression mittels eines heterologen CMV-Promotors ermöglicht, eingefügt. Es wurde das mit pBLR1-MYC, bezeichnete Plasmid erhalten.

Beispiel 2

Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen.

Zur Expression von L-GCR in Eukaryoten wurde die humane embryonale Nierentumorzellinie 293 (ATCC CRL 1573) verwendet. Hierzu wurden ca. 1-2 x 10° Zellen mit 15 μ g des Plasmids von Beispiel 1 mittels Calciumphosphat-Präzipitationstechnik transfiziert. Die Plasmid-DNA wurde zuvor aus den transformierten Bakterien über Ionenaustauschchromatographie isoliert. Zur Etablierung stabil exprimierender Zellinien wurden Antibiotika-resistente Zellen des Transfektionsansatzes durch Zusatz von Neomycin (200 μ g/ml) angereichert und in der Expression des L-GCR-MYC-Fusionsproteins wurden positive Zellinien durch Einzelzellverdünnung isoliert. Die Kontrolle der Expression des Fusionsproteins erfolgte sowohl bei transient als auch bei stabil transfizierten Zellen mittels Durchflußcytometrie an permeabilisierten Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 9E10.

Beispiel 3

Herstellung monoklonaler Antikörper

Immunisierung einer Ratte

Weibliche, acht Wochen alte, Lou/C Ratten wurden mit je 3x10' lebenden L-GCR-transfizierten 293-Zellen immunisiert. Nach 28 Tagen erfolgte der Booster mit der gleichen Menge des Immunogens.

Zellfusion

60 Stunden nach der letzten Immunogenverabreichung wurde die Fusion in üblicher Weise durchgeführt (vgl. z.B. Köhler G. und C. Milstein, Nature 256 (1975), 495-497). Hierbei wurde der immunisierten Ratte unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen, durch ein Sieb zerrieben und die gewonnenen Zellen wurden im Verhältnis 1:3 mit Zellen der Mäuse-Myelomzellinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979) 1548-1550) mit Hilfe von PEG fusioniert. Eine Woche nach der Aussaat in Flachbodenplatten in HAT-Selektivmedium wurde das Koloniewachstum protokolliert und die Zellkulturüberstände koloniehaltiger Vertiefungen wurden im Durchflußcytometer (vgl. nachstehend) vergleichend auf stabilen L-GCR-exprimierenden 293 Zellen und normalen 293 Zellen auf das Vorhandensein L-GCRspezifischer Antikörper getestet. Nur solche Antikörper, die an transfizierten Zellen gebunden haben, nicht jedoch an normalen 293 Zellen, wurden nach der Limiting dilution-Technik kloniert, weitervermehrt, auf transient transfizierten 293 Zellen und schließlich auf peripheren Leukozyten getestet.

Durchflußcytometrie

Das Vorhandensein von L-GCR-Antikörpern wurde mittels Durchflußcytometrie getestet. Als Testsystem wurden vergleichende Messungen an L-GCR-transfizierten und unveränderten 293 Zellen durchgeführt. Je 25 μ l Hybridomzellen-Überstand wurden mit 25 μ l der jeweiligen Zellsuspension (1x10 $^7/m$ l) für 25 min bei RT inkubiert. Nach Waschen in PBS (4% FKS, 5 mM EDTA) wurden die Zellen mit einer 1:160 Verdünnung eines polyklonalen Ziegeanti-Ratte-FITC Konjugates versetzt. Nach 25-minütiger Inkubation und anschließendem Waschen erfolgte der Nachweis einer

10

spezifischen 'Bindung mittels eines FACScan Durchflußcytometers. Je Probe wurden 5000 Zellen gemessen und die Fluoreszenzintensität der Zellpopulation wurde analysiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität von transfizierten und unveränderten 293 Zellen konnten solche Antikörper identifiziert werden, die spezifisch an L-GCR binden.

Bindungsstudien des erfindungsgenäßen Antikörpers RF8B2

Vorstehend angegebene 293 Zellen wurden mit L-GCR codierender DNA in üblicher Weise transfiziert bzw. nicht transfiziert. Letztere Zellen wurden als mock-transfiziert bezeichnet. Der erfindungsgemäße Antikörper RF8B2 wurde in üblicher Weise mit Biotin markiert und den Zellen zugegeben. Es zeigte sich, daß RF8B2 an transfizierte 293 Zellen bindet, nicht jedoch an mock-transfizierte (vgl. Fig., A).

Desweiteren wurden periphere Leukozyten des Blutes über Ficoll gereinigt und mit dem T-Zell-spezifischen Antikörper CD4-FITC (B) oder CD8-FITC (C) bzw. mit dem B-Zell-spezifischen Antikörper CD19-FITC (D) angefärbt. Anschließend wurde der Biotinmarkierte Antikörper RF8B2 zugegeben. Es zeigte sich, daß 100% der B-Zellen (CD19-positiv) (D) diesen Antikörper binden. Hingegen wird RF8B2 nur von ca. 14% der T-Helfer-Zellen (CD4positiv) (B), und ca. 2% der zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) (C) gebunden (vgl. Fig., B, C und D). Dies zeigt die Verwendbarkeit von RF8B2, eine unterschiedlich starke Expression von L-GCR aufzuzeigen.

Produktion und Reinigung von Antikörpern

Probenpuffer	pH 7,4	PBS
Elutionspuffer	pH 2,5	0,05 M Glycin
•		0,05 M NaCl
10fach Tris-HCl-Puffer	pH 8,6	0,5M Tris
		1 EW NaCl

11

Die Hybridomzellen wurden im RPMl mit 10% IgG-freiem FKS vermehrt, alle 2-3 Tage 1:3 geteilt und der Zellkulturüberstand wurde gesammelt. Zur Abtrennung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde die Protein G-Affinitätschromatographie verwendet (vgl. Björck und Kronvall, J. Immunol. 132 (1984) 969-974). Hierzu wurde 1 g Protein G Sepharose 4 Fast Flow nach Quellung in eine Chromatographiesäule gepackt und mit PBS äquilibriert. 200 ml des zu reinigenden Überstandes wurden nach Mikrofiltration auf die Säule aufgebracht. Ein Wechsel von PBS auf Elutionspuffer löste die an die Sepharose gebundenen Antikörper. Die dem Extinktions-Peak entsprechenden Eluatfraktionen wurden gegen PBS-dialysiert.

Markierung von Antikörpern

Biotin-Markierung:

PBS Kupplungspuffer pH 7,4

Biotinprāparat NHS-LC-Biotin

Hierbei wurde die Kupplung mit Abwandlungen wie beschrieben, ausgeführt (vgl. 2.B. Peters et al., Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag, Berlin (1985)). Protein G gereinigte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und gegen Kupplungspuffer 24 Stunden dialysiert. Zur Reaktion wurden 50 μ l Biotinlösung (8 mg Biotin in 1 ml DMF) zu 1,0 ml MAk-Lösung gegeben und 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Dialyse gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjuagte bei -20°C gelagert.

FITC-Konjugate:

pH 9,5 0.1M NaHCO, Kupplungspuffer

FITCpräparat Fluoresceinisothiocyanat,

Protein G gereingte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und mit 1/10 Vol. 10fach Kupplungspuffer versetzt. Zur Reaktion wurden 60 /ul FITClösung (1mg FITC in 1 ml Kupplungspuffer) zu 1,0 ml mAk-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Dialyse'gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjugate bei -20°C gelagert.

Patentansprüche

- 1. Monoklonaler Antikörper gegen Leukozyten-spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptor (L-GCR), erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:
 - (a) Einführung einer L-GCR-codierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von L-GCR,
 - (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und
 - (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen.
- Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2153 hinterlegt worden ist.
- 3. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure eine DNA ist.
- 4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eine cDNA ist.
- 5. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure Additionen, Deletionen und/oder Substitutionen von ein oder mehr Basen umfaßt.
- Antikörper nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure Markersequenzen umfaßt.

- 7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegt.
- Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen eukaryotische Zellen umfassen.
- Antikörper nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen Säugetier-, Hefe- und Insektenzellen umfassen.
- 10. Antikôrper nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tiere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse umfassen.
- 11. Verwendung des Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 10 für diagnostische oder therapeutische Maßnahmen.
- 12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Maßnahmen die Bestimmung des Immunstatus eines Patienten sowie den Nachweis von Tumoren, Leukämien, Lymphomen, Immunschwächen und Autoimmunerkrankungen umfassen.
- 13. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutischen Maßnahmen die Beeinflussung der Funktion von Blutzellen, z.B. die Hemmung von Entzündungen, und die Unterdrückung einer Tumormetastasierung umfassen.

14. Kit, enthaltend

- markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche
 1 bis 10, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der
 Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper
 - oder
- markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche

1 bis 10 und T-Zell-spezifischen Antikörper und/oder B-Zell-spezifischen Antikörper sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.

- 15. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR), gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - (a) Einführung einer GCR-codierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von GCR,
 - (b) Immunisierung eines Tieres mit GCR-exprimierenden Zellen von (a), und
 - (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von(b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale,GCR-Antikörper- produzierenden Hybridomzellen.

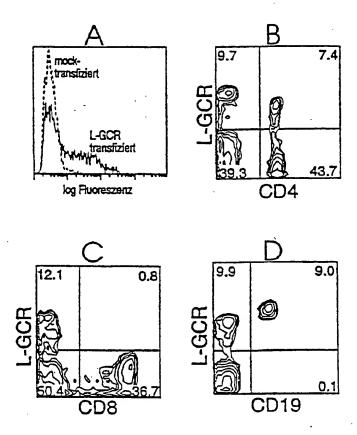


Fig.: Bindungsstudien der erfindungsgemäßen Antikörper RF8B2 an 293 Zellen und peripheren Leukozyten

hr icnal Application No
PCT/EP 94/03175

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28 A61K39/395 G01N33/	577 C12P21/08				
 	nternational Patent Classification (IPC) or to both national class	iffestion and IPC	•			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 CO7K A61K GO1N C12P						
Dogwentst	ion warrhed other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the fields a	earched			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data-base and, where practical, search terms used)						
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.			
٨	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLE vol.373, no.9, September 1992, B page 840	R, RD	1-15			
	I. WOLF ET AL. 'Differentiation- expression of a novel G protein- receptor fromm Burkitt's lymphom see abstract	coupled				
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.22, no.11, November 1992, WE BRD pages 2795 - 2799	INHEIM,	1-15			
	T. DOBNER ET AL. 'Differentiation expression of a novel G protein- receptor from Burkitt's lymphoma	coupled				
		-/				
ļ	-					
		•.				
X Pure	her documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.			
* Special categories of cited documents: "I later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but						
'A' docum	"A" document defining the general state of the art which is not cited to understand the principle or theory underlying the considered to be of particular relevance invention.					
"E" earlier	document but published on or after the international date	"X" document of particular relevance; the	C DE CORREGIENT TO			
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or involve an inventive step when the document is taken alone which is cited to establish the publication date of another "Y" document of particular relevance; the date and another "Y" document of particular relevance; the date of another "Y" document of particular relevance and "Y" document of particular releva						
disting or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disciours, use, exhibition or ment of the combination being obvious to a person skilled						
'P' document published prior to the international filing date but						
<u></u>	han the priority date claimed actual completion of the international search	Date of mailing of the international a				
2 January 1995		2 3 -01- 1995				
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3111 Patentiaan 2	Authorized officer				
	NL - 2230 HV Riswift Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo al.	NOOIJ, F				

be tional Application No PCT/EP 94/03175

		PCT/EP 94/031/5		
C(Cooling	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Reinvent to daim No.		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			
P,X	CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.40, no.3, May 1994, NOISY-LE-GRAND, FRANKREICH' pages 413 - 419 T. EMRICH ET AL. 'Transmembrane topology of the lymphocyte-specific G-protein-coupled receptor BLR1: Analysis by flow cytometry and immunocytochemistry.'	. 1-15		
P,X	BLOOD, vol.84, no.3, 1 August 1994, NEW YORK NY, VSA pages 830 - 840 R. FÖRSTER ET AL. 'Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells.'	1-15		
P;X	BIOCHENICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol.196, no.3, 15 November 1993, DULUTH MN, VSA pages 1496 - 1503 R. FÖRSTER ET AL. 'A general method for screening mAbs specific for G-protein coupled receptors as exemplified by using epitope tagged BLR1-transfected 293 cells and solid phase cell ELISA.' see the whole document	1-15		
		·		
		·		

International application No. PCT/EP94/03175

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:			
L X	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:		
Se	e annex.		
2 🗀	Claims Nos.:		
	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:		
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).		
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This Inte	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
	·		
. —	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all		
" Ш	searchable claims.		
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.		
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:		
	·		
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:		
D	on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
Kemark	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International application No. PCT/EP94/03175

Observation: Although claims 11-13 relate (all in part, in so far as they pertain to an in vivo procedure) to a method for treatment of the human or animal body or to a diagnostic procedure carried out on the human or animal body, the search has been conducted, based on the indicated effects of the compound or composition.